

胃癌患者末梢血単球の抗腫瘍活性に関する検討

金沢大学がん研究所外科講座 (主任：磨伊正義教授)

上 野 雅 資

(昭和62年1月23日受付)

胃癌患者における末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL) の抗腫瘍効果に関して、モノクローナル抗体によるリンパ球亜分画の同定および natural killer (NK) 活性について、癌の組織学的進行度による変動を検討するとともに、recombinant interleukin 2 (rIL-2) 刺激による NK 活性増強作用および OK-432 刺激による interleukin 2 (IL-2) 産生能を測定し、OK-432 の効果発現に対する IL-2 を用いた検討を行った。PBL の亜分画については、OKT3 陽性細胞 (末梢血 T 細胞)、OKT4 陽性細胞 (ヘルパー/インデューサー T 細胞) の減少が IV 期において認められたが、T4/T8 比、Leu7 陽性細胞 (NK 細胞) は、各進行期間に有意差はなかった。NK 活性についても、各進行期間に有意差は認めなかった。PBL は、rIL-2 10 U/ml 存在下で、1 日間培養後に NK 活性の最高値を示し、II & III 期において有意の増強を示した。OK-432 刺激による IL-2 産生能は、各進行期間に有意差は認められなかったが、胃癌患者および健康成人においても幅広い分布を示し、個体差が著明であった。また、この反応と、従来 OK-432 の投与指標として用いられてきた Su-polysaccharide (Su-PS) 皮内反応との相関は認められなかった。以上の成績より、胃癌患者では、進行した病期においても PBL の細胞性免疫能は比較的保たれており、IL-2 による PBL の賦活化が可能と考えられるが、OK-432 の全身投与による IL-2 を介する抗腫瘍効果を期待するならば、in vitro での OK-432 刺激による IL-2 産生能の個体差を考慮する必要があることが示唆された。

Key words 胃癌, NK活性, インターロイキン 2 OK-432

近年、胃癌の手術成績は向上し、その理由として胃診断学の進歩による早期例の増加に負う処が大きい。しかし、進行癌の根治手術例であっても、一定期間後に再発を来す症例が後を絶たないことをみてもわかるように、可視範囲を越えた遺残微小転移 (residual micrometastasis) の存在を常に考慮する必要がある。このため、多くの施設で術後の補助化学療法がおこなわれているが、満足すべき成績は得られていない¹⁾。

その反省として、これまでの化学療法は癌細胞を攻撃する事のみに目を向けてきた傾向にあるが、抗癌剤投与と宿主の免疫応答には種々の関わり合いがみられ、効率の良い化学療法のためには、宿主の免疫能の改善を目的とした治療が求められた^{2)~5)}。この免疫増強を目的とする試みは、従来、『癌の免疫療法』のカテゴリーに分類されてきたが、近年、米国を中心として、

これらを biological response modifiers (BRM) として一括し、いたずらに臨床効果を求めるよりも、作用機序に重点をおいた基礎的研究が重視されるようになってきた^{6)~8)}。特に T 細胞の増殖・活性因子として知られる interleukin 2 (IL-2) は、Taniguchi⁹⁾らによって遺伝子の全塩基配列が決定され、大腸菌を用いた遺伝子組み換えによる recombinant interleukin 2 (rIL-2) が大量に産生可能になって以来、種々の抗腫瘍免疫反応に介在する^{10)~14)} ことなど物理・生物学的性質が明らかになっており、従って、この IL-2 を中心とした解析を行うことにより、現在臨床的に広く用いられている OK-432 などの免疫療法の効果発現機序を明らかにすることが可能と考えられる。

そこで、本研究では、胃癌患者末梢血リンパ球を用い、第一に、無感作状態での免疫能として、リンパ球

Abbreviations: BRM, biological response modifiers; FCS, fetal calf serum; IL-2, interleukin 2; LAK, lymphokine activated killer; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocyte; PBS, phosphate buffer saline; rIL-2, recombinant interleukin 2; Su-PS, Su-polysaccharide.

亜分画およびNK活性の癌進行程度による変化を検討し、ついで、BRMに対する反応性として、in vitroでのrIL-2による細胞障害活性の増強効果およびOK-432刺激によるIL-2産生誘導能などを測定し、これらの胃癌進行程度による変動を中心に検討を行った。

対象および方法

I. 対 象

1984年10月より1985年12月までの期間に、金沢大学がん研究所付属病院外科において、胃切除術を施行し、組織学的検索をおこなった胃癌患者32名を対象として、これらの術前の末梢血リンパ球を用いた。年齢は32~78歳(平均58.2歳)、性別は男性24名、女性8名であった。病理組織学的分類では、管状腺癌20名、低分化腺癌11名、印鑑細胞癌1名であった。病期分類は、胃癌取り扱い規約¹⁵⁾に従った。対照として、健康成人10名(男性8名、女性2名、平均年齢52.3歳)の末梢血リンパ球について検討した。

胃癌各病期の症例および対照とした健康成人の生物学的背景(表1)は、年齢に有意差はなく、男女比は、II&III期を除いてほぼ同率であった。また、一般に栄養学的指標として用いられる血清アルブミンおよび末梢血リンパ球数は、対照および胃癌各病期間に有意差は認められなかった。なお、今回対象としたIV期患者は、比較的一般状態の良い手術可能例で、低栄養状態のいわゆる末期の症例は含まれていない。

II. リンパ球の分離と調整

ヘパリン加末梢血を20 ml採取し、Ficoll-Hypaque比重遠心法により分離した。すなわち、術前に採取したヘパリン加末梢血を、0.1 M リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4) (phosphate buffered saline, PBS) にて約2倍に希釈後、Ficoll-Hypaque液(比重1.077) (Lymphoprep) (Nyegaard, Oslo, Norway) 上に静に重層し、400×g、室温で、20分間遠心した。遠心後、その中間層をピペットにて採取し、アンピシリン60 μg/ml、カナマイシン60 μg/mlを加えたRPMI-1640

(Gibco, Gran Island, New York, U.S.A.) にて3回洗浄した。次いで、これらを非働化仔牛血清(heat-inactivated fetal calf serum, FCS) (Gibco) を10%濃度に加えたRPMI-1640培地中に浮遊させた。

III. モノクローナル抗体によるリンパ球亜分画の同定

ヒトリンパ球に対する各種モノクローナル抗体¹⁶⁾を用い、胃癌患者末梢血リンパ球のリンパ球亜分画を測定した。2本のガラス試験管に各々100 μlのPBSを分注し、よく混合したヘパリン加全血を100 μlずつくわえた。対照試験管には10 μlのPBSを加え、もう1本にモノクローナル抗体10 μlを加え、4℃で20分間反応させた。これに2 mlの赤血球溶解用試薬(lysing reagent)を加え、10分間室温で反応させた後、レーザーフローサイトメーター、スペクトラムIII (Ortho Dynami System, Raritan, New Jersey, U.S.A.) によって、蛍光細胞数を測定した。使用したモノクローナル抗体は、すでに蛍光標識された市販品をもちいた。すなわち、末梢血Tリンパ球反応性のOKT3、ヘルパー/インデューサーTリンパ球反応性のOKT4、サプレッサー/キラーTリンパ球反応性のOKT8 (Ortho Diagnostic System), NK細胞に反応性のLeu7 (Beckton-Dickson, Mountain View, California, U.S.A.) などを用いた。

IV. NK活性の測定(図1)

ヒト赤白血病由来のK-562細胞株を用い、⁵¹Cr放出法により測定した^{17)~20)}。すなわち、Ficoll-Hypaque比重遠心法により分離した新鮮リンパ球を、10% FCS加RPMI-1640培養液中にて5×10⁶ cells/mlに調整し、その50 μl/孔をU底マイクロプレート(Nunk)に1検体につきそれぞれ4孔ずつ分注し、エファクター細胞とした。一方、ターゲット細胞としては、約1×10⁶ cells/mlのK562細胞浮遊液1 mlに、100 μlのNa₂⁵¹Cro₄, 3 mCi/3 ml (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.)を加え、37℃、5% CO₂下で2時間培養標識後、10% FCS加RPMI-1640培地に浮

Table 1. Clinical background factors of patients with gastric cancer

Stage of gastric cancer	Number of cases examined	Age	Sex (♂/♀)	Serum albumin (g/dl)	Lymphocyte (/mm ³)
I	15	60±9	12/3	3.9±0.5	2110±900
II & III	6	56±11	3/3	4.0±0.7	2070±440
IV	11	57±9	9/2	3.8±0.9	2000±560
control [#]	10	52±9	8/2	4.2±0.5	2330±800

Values are expressed as mean±S.D. [#], Healthy adults.

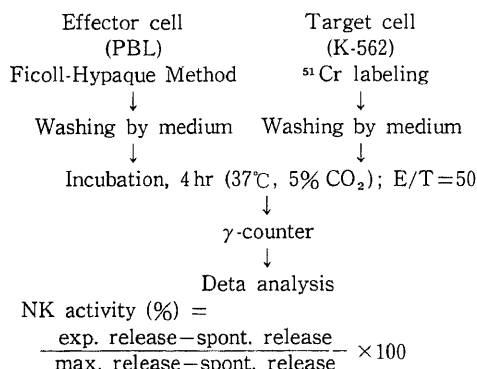


Fig.1. Schematic outline showing the measurement of NK activity by ^{51}Cr release assay.

遊し、 ^{51}Cr 標識 K-562 細胞浮遊液とした。次に、これを 1×10^5 cells/ml に調整し、エファクター細胞 $50 \mu\text{l}$ を分注した孔に、 $50 \mu\text{l}$ ずつ加えた。この条件で、エファクター：ターゲット比は 50：1 である。このプレートに、 37°C 、5 % CO_2 下で 4 時間培養後、各孔の上清 $50 \mu\text{l}$ を採取し、上清中に放出された ^{51}Cr 活性をシンチレーションカウンター (auto well gamma counter, アロカ, 東京) にて測定し、下記の計算式により算出し、これを NK 活性値とした。

$$\text{NK activity (\% cytotoxicity)} = \frac{\text{experimental } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}}{\text{maximum } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}} \times 100$$

$$\text{NK activity (\% cytotoxicity)} = \frac{^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}}{\text{maximum } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}} \times 100$$

なお、maximum release は、ターゲット細胞に 0.1 % ノイニデット P-40 を $50 \mu\text{l}$ 加えた場合の ^{51}Cr 放出量で、最大 ^{51}Cr 放出量を示し、spontaneous release は、10 % FCS 加 RPMI-1640 培養液 $50 \mu\text{l}$ を加えた場合のターゲット細胞からの ^{51}Cr 自然放出量である。

IV. rIL-2 添加培養による細胞障害活性の増強の測定

まず、健康成人 5 名のリンパ球浮遊液を用いて、rIL-2 至適添加濃度および添加培養時間を決定した。すなわち、 1×10^6 cells/ml 濃度のリンパ球浮遊液に、rIL-2 (塩野義製薬, 東京) を 0, 3, 30, 10, 30, 100 U/ml の各濃度で添加し、 37°C 、5 % CO_2 下で 24 時間培養し、これをエファクター細胞として NK 活性を測定した。このうち、十分な活性を示す最低濃度を rIL-2 至適濃度とした。次に、この至適濃度にて、1 日、3 日、5 日間の各期間培養を行い、そのリンパ球をエファクター細胞として、NK 活性を測定し、培養時間を決定した。この条件にて、各検体リンパ球を培養し、NK 活性

を測定した。また、対照として、rIL-2 の代わりに 10 % FCS 加 RPMI-1640 培養液添加した培地にて、同様の条件で培養を行ったリンパ球を用いて、NK 活性を測定した。

VI. OK-432 添加による IL-2 産生実験

1. IL-2 被検体の調整 (OK-432 による IL-2 の誘導)

Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて得たリンパ球浮遊液を、 1×10^6 cells/ml 濃度で、2 % FCS 加 RPMI-1640 培養液中に浮遊させ、その 1 ml を 13×100 mm のプラスチック管 (Falcon) に分注した後、OK-432 を 0.05 KE/ml (乾燥菌体 0.005 mg) の濃度に添加し、 37°C 、5 % CO_2 下で 48 時間培養した。この後、 $200 \times \text{g}$ 、 4°C で 10 分間遠心し、その上清を IL-2 被検体とした。なお、OK-432 の至適添加濃度および時間は既報⁽⁴⁾に従った。

2. IL-2 力価の測定

マウス由来の IL-2 依存性増殖 T 細胞培養株 CTLL-2 細胞を用いたマイクロアッセイ⁽²¹⁾⁽²²⁾にて、上記培養液中の IL-2 活性を測定した。すなわち、CTLL-2 細胞を 20 % FCS 加 RPMI-1640 培養液にて 5×10^4 cells/ml 濃度に調整し、96 穴平底マイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ (5×10^3 cells/ml) ずつ分注した後、これらに、IL-2 被検体を RPMI-1640 培養液にて 2 倍段階希釈したものを $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C 、5 % CO_2 下で 24 時間培養した。この後、トリチウム チミジン (^3H -TdR, New England Nuclear) $0.5 \mu\text{Ci}$ ($40 \mu\text{l}$) を各穴に加え、4 時間標識した後、細胞内取り込み量を放射活性として、液体シンチレーションカウンター LSC-700 (アロカ) にて測定した。IL-2 活性値 (U/ml) の算出は、標準検体 (rIL-2, 100 U/ml) の ^3H -TdR の最大取り込み量の 50 % 値を与える検体の log 2 稀釈倍率 U/ml として表現した。

VII. Su-polysaccharide (Su-PS) 皮内反応の実施

Su-polysaccharide (Su-PS) は、Streptococcus pyogenes の Su 株の細胞壁成分よりえられた 8 % の蛋白質を含む製剤で、この皮内反応は、遅延型過敏反応の一種と考えられている⁽²³⁾。対象となった胃癌患者 32 名に対して、術前に本剤 0.1 ml ($20 \mu\text{g}$) を皮内投与し、24 時間後に、注入部位に出現した紅斑の平均径 (最大径 + 最小径 / 2) を測定した。

VIII. 統計処理法

以上、各測定値は、平均値 ± 標準偏差値 (mean ± S.D.) をもって示した。対応のある場合の平均値の有意差検定には、paired t-test を用い、多群間の有意差検定には、分散分析後多重比較検定を行い、危険率 5 % 以下を有意差有りと判定した。

成績

I. 末梢血リンパ球亜分画

末梢血リンパ球亜分画を、胃癌患者各進行病期および健康成人対照について検討した(表2)。OKT3陽性細胞数は、対照者 $1540 \pm 210/\text{mm}^3$ で、胃癌患者I, II&III期との間に有意差はなかったが、IV期において $1050 \pm 420/\text{mm}^3$ と対照者に対して有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。OKT4陽性細胞数も、対照者 $1000 \pm 140/\text{mm}^3$ とI期, II期&III期との間に有意差はなかったが、IV期では $540 \pm 260/\text{mm}^3$ と有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。OKT8陽性細胞数は、対照者 $580 \pm 120/\text{mm}^3$ と胃癌各進行期との間に有意差はなかった。また、OKT4陽性細胞とOKT8陽性細胞の比率(T4/T8値)は、対照者の 1.75 ± 0.50 に対して、胃癌各進行期と有意差はなかった。Leu7陽性細胞数も、対照者の $510 \pm 200/\text{mm}^3$ に対して有意差は認められなかった。

このように、PBLの分画については、OKT3, OKT4陽性細胞の減少がIV期において見られたが、T4/T8比、Leu7陽性細胞は、各進行期間には有意差はなかった。

II. 末梢血リンパ球のNK活性

末梢血リンパ球のNK活性(図2)は、胃癌患者の組織学的進行度I期 $49.2 \pm 19.6\%$ 、II&III期 $58.7 \pm 7.1\%$ 、IV期 $49.2 \pm 19.1\%$ であり、IおよびIV期で低下傾向がみられたが、対照者の $52.8 \pm 12.4\%$ との間に有意差は認められなかった。

III. rIL-2添加によるNK活性の増強

1. rIL-2培養濃度の設定

健康成人5名の末梢血リンパ球 5×10^6 cells/ml をrIL-2 0, 3, 10, 30, 100 U/mlの各濃度で24時間培養した後、そのNK活性を測定した(図3)。rIL-2 10 U/ml以上の濃度で添加培養したリンパ球は、全て十分な細胞障害活性が得られた。従って、以下の実験に

Table 2. Lymphocyte subsets of PBL in patients with gastric cancer

Stage of gastric cancer	Number of case examined	Number (/mm ³) of PBL reacted with monoclonal antibody;				
		OKT3	OKT4	OKT8	Leu7	T4/T8
I	15	1520 ± 620	920 ± 490	560 ± 290	470 ± 280	1.66 ± 1.33
II & III	6	1500 ± 470	950 ± 280	570 ± 240	480 ± 140	1.65 ± 0.83
IV	11	$1050 \pm 420^*$	$540 \pm 260^*$	400 ± 230	450 ± 200	1.35 ± 0.95
control [#]	10	1540 ± 210	1000 ± 140	580 ± 120	510 ± 200	1.70 ± 0.50

Values are expressed as mean \pm S.D. [#], Healthy adults.

*, $p < 0.05$ vs. control by pooled t-test.

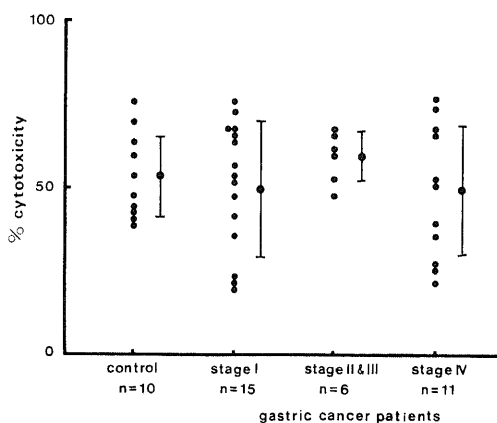


Fig. 2. NK activity of PBL in patients with gastric cancer.

PBL were investigated for lysis of K-562 cells in 4 hr-⁵¹Cr release assay. Effector-to-target ratio was 50:1.

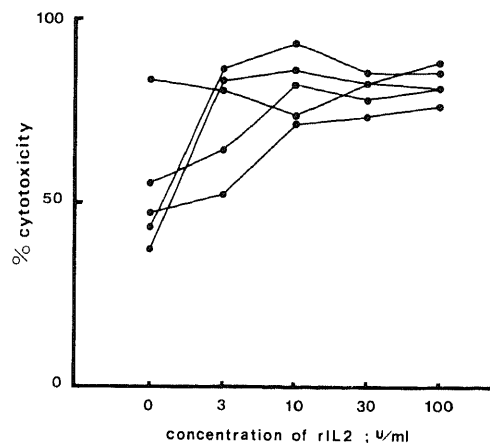


Fig. 3. Dose response of rIL-2 inducing NK activity.

PBL from healthy adult were tested for lysis of K-562 after incubation in RPMI-1640 medium containing 10% FCS and rIL-2 for 24 hr.

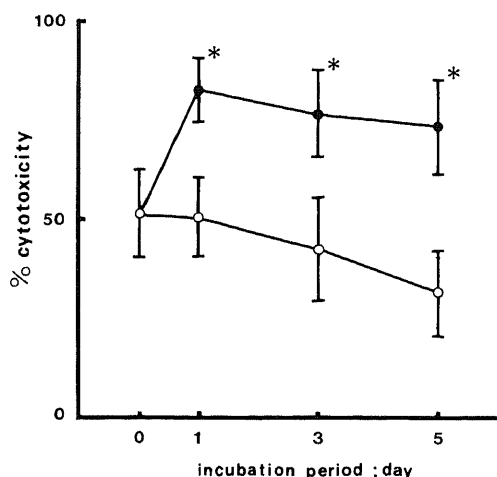


Fig. 4. Kinetics of NK activity induced by rIL-2. PBL from healthy adult were tested for lysis of K-562 after incubation in RPMI-1640 medium containing 10% FCS and rIL-2 (10 U/ml) for 0, 1, 3 and 5 days. Each bar represents mean \pm S.D. \circ , rIL-2 (-); \bullet , rIL-2(+); *, $p < 0.01$ by paired t-test.

於いては、10 U/ml を rIL-2 の至適量とした。

2. rIL-2 培養時間の設定

健康成人 5 名の末梢血リンパ球 5×10^6 cells/ml を用いて、rIL-2 添加培養前、および培養後 1 日目、3 日目、5 日目の NK 活性を測定し、細胞障害活性の経時的变化をみた (図 4)。K562 細胞にたいする NK 活性は、rIL-2 投与前は、 $51.5 \pm 10.9\%$ であったが、rIL-2 添加培養 1 日目には、 $81.8 \pm 8.2\%$ と最高値に達し、rIL-2 の代わりに 10% FCS 加 RPMI-1640 培地を添加した対照群に比して有意の ($p < 0.01$) 増強を示した。また、rIL-2 添加群では、3 日目および 5 日目の NK 活性は、それぞれ $76.0 \pm 10.1\%$ 、 $72.5 \pm 12.0\%$ と活性の増強が維持されていたのに対して、対照群では、3 日目 $42.3 \pm 14.5\%$ 、5 日目 $31.4 \pm 12.7\%$ と、暫時低下傾向を示し、rIL-2 添加群との間に有意差 ($p < 0.01$) が認められた。以上の結果より、rIL-2 添加後 1 日目に十分な NK 活性が得られると判定した。

3. 胃癌進行程度による変動

胃癌患者および健康成人対照者の末梢血リンパ球を用いて、至適培養条件すなわち rIL-2 10 U/ml 添加培

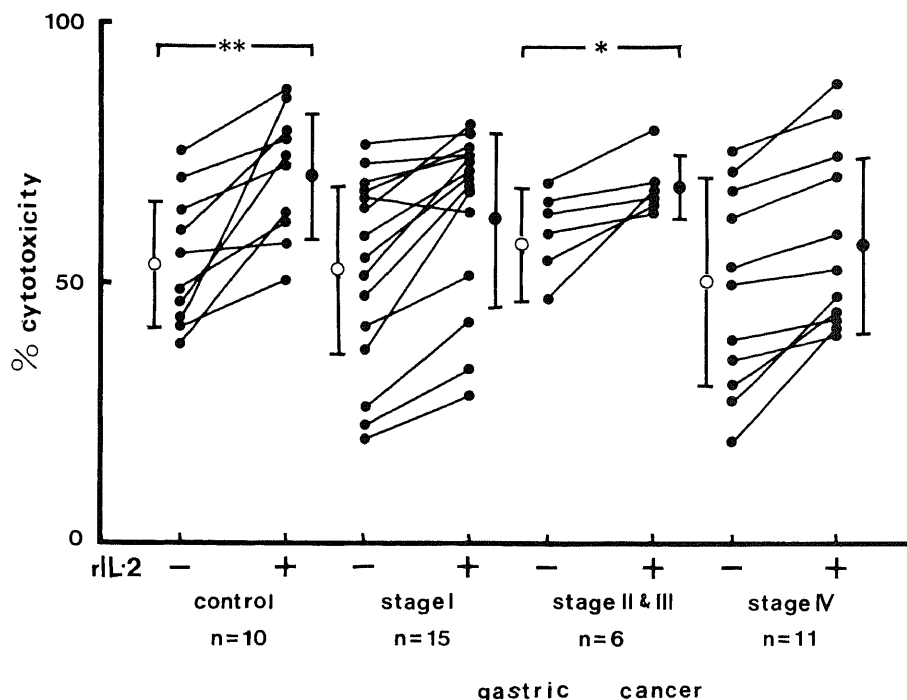


Fig. 5. Augmentation of NK activity of PLB in gastric cancer patients: Influence of pretreatment with rIL-2. PBL were tested for lysis of K-562 after incubation in RPMI-1640 medium containing 10% FCS and rIL-2 (10 U/ml) for 24 hr. Each bar represents mean \pm S.D. \circ , rIL-2 (-); \bullet , rIL-2 (+); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ by paired t-test.

養後1日目の rIL-2 添加群 (rIL-2+) の NK 活性を測定し、rIL-2 の代わりに 10%FCS 加 RPMI-1640 培地を添加培養した rIL-2 非添加群 (rIL-2-) の NK 活性とを比較した (図5)。健康成人対照群では、rIL-2 非添加群の NK 活性が $53.2 \pm 13.0\%$ であったのに対して、rIL-2 添加群では $70.3 \pm 11.1\%$ と有意な ($p < 0.01$) 活性増強が認められた。これに対して、胃癌患者進行程度 I 期では rIL-2 非添加群 $51.2 \pm 18.5\%$ に対して、rIL-2 添加群 60.6 ± 17.1 と増強傾向をみたが、両者間に有意差はなかった。II & III 期では、rIL-2 非添加群 $57.8 \pm 8.1\%$ 、rIL-2 添加群 $67.7 \pm 5.3\%$ であり、有意な ($p < 0.05$) 活性増強が認められた。また、IV 期では、rIL-2 非添加群 $47.5 \pm 20.0\%$ 、rIL-2 添加群 $58.1 \pm 17.2\%$ とやはり増強傾向がみられたが、有意差は得られなかった。

IV. OK-432 刺激による rIL-2 産生能

1. 胃癌進行程度による変動

末梢血リンパ球の OK-432 刺激に対する IL-2 産生能の、胃癌進行程度による変動について検討した (図6)。健康成人対照者では 14.7 ± 16.0 U/ml であったのに対して、胃癌 I 期 12.0 ± 13.6 U/ml、II & III 期 6.7 ± 5.4 U/ml、IV 期 7.3 ± 7.7 U/ml と病期の進行に伴い低下傾向を示したが、対照者との間に有意差はなかった。一方、各群とも IL-2 産生能において幅広い分布をしめし、固体差が著明であり、IL-2 産生誘導の全く認められない無反応者 (non responder) が、健康成人 3 名 (30.0%)、胃癌患者 9 名 (28.1%) に認められ

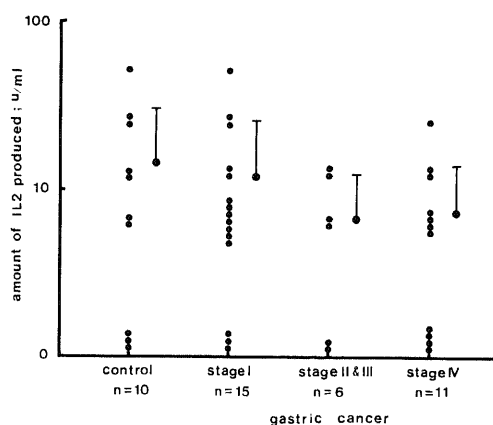


Fig. 6. IL-2 production in response to OK-432 stimulation in patients with gastric cancer by PBL. PBL were cultured in the presence of OK-432 (0.05 KE/ml) for 2 days, and supernatants were tested for IL-2 activity by CTLI-2 microassay. Each bar represents mean \pm S.D.

た。また、IL-2 産生能 10 U/ml 以下のものを仮に低反応者 (low responder) とすると、これらは、健康成人 5 名 (50.0%)、胃癌患者 22 名 (68.8%) を占めた (図7)。

2. NK 活性, Su-PS 皮内反応との比較

OK-432 刺激による IL-2 産生量 10 U/ml 以下のものを低反応者、それ以上のものを高反応者として、両者間における他の免疫パラメーターとの比較を、NK 活性および Su-PS 皮内反応について行った (表3)。胃癌患者 32 名中 10 名の高反応者での NK 活性は $50.0 \pm 18.0\%$ であり、22 名の低反応者での $40.0 \pm 18.6\%$ との間に有意差は認められなかった。また、Su-PS 皮内反応についても、高反応者 9.2 ± 8.0 mm, 低反応者 9.3 ± 9.0 mm, であり、両者間に有意差は認めなかった。

考 察

最近、ヒトの免疫学の進歩はめざましく、各種の免疫応答が異なったリンパ球サブセット間の協調作用により遂行されていることが判明し、このヒト T リンパ球亜分画を、細胞表面の抗原性の差異により認識し得るモノクローナル抗体が多数開発された²⁴⁾。特に、蛍光色素による標識を利用したフローサイトメーターの活用により、末梢血 T リンパ球サブセットの定量的解析が広く行われるようになって以来、種々の疾患ですで

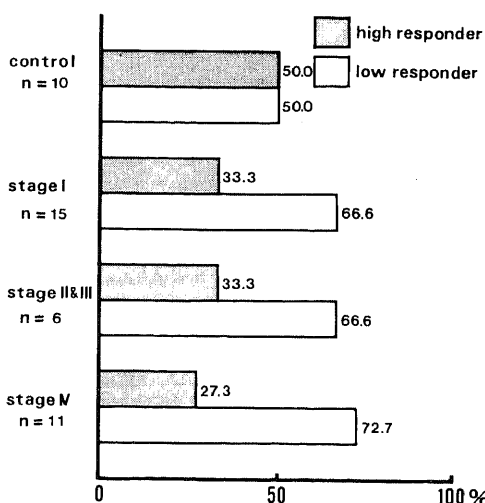


Fig. 7. Response rate (%) of OK-432 stimulated IL-2 production in gastric cancer.

High responder represents those who show relatively large amount (>10 U/ml) of IL-2 production stimulated by OK-432. Low responder represents those who show little amount (≤ 10 U/ml) of IL-2 production.

に臨床的意義が明らかにされている。一方、悪性腫瘍については、従来より生体防御機構のうちでもT細胞を中心とする癌細胞障害活性が報告されており²⁵⁾、癌の進展に伴うT細胞分画の変動は興味のもたれるところである。そこで、本稿では胃癌患者を対象に、これらT細胞亜分画を認識するとされているOKTシリーズモノクローナル抗体を用い、T細胞分画の癌の進行度による変化を検討した。なお、極めて全身状態の悪化した、いわゆる末期の患者では、栄養状態の低下と共にあらゆる免疫能の低下が知られているため、今回の対象からは除外した。末梢血Tリンパ球は、大部分OKT3陽性であり、これらは機能的にヘルパー/インデュースT細胞とサプレッサー/キラーT細胞とに大別され、それぞれOKT4およびOKT8によって標識される。担癌生体では、T細胞数の減少、OKT4陽性細胞の減少、T4/T8比の増大が報告されている²⁶⁾²⁷⁾、今回の胃癌患者の検討でも、遠隔転移や腹膜転移を来しているIV期において同様の傾向を示したが、術後免疫療法之最も良い適応となる治癒切除可能なII&III期までは、T細胞の数、分画とも良く保たれており、比較的正常な細胞性免疫能を維持していることが判明した。

一方、NK細胞とは、実験動物での移植腫瘍に対する細胞性免疫反応や、癌患者における腫瘍特異的細胞障害反応の研究過程で“background noise”として観察されていた細胞障害反応をHerberman¹⁷⁾、Kissling¹⁸⁾らが体系化したもので、明らかな特定の免疫刺激や誘導操作を受けず、種々の腫瘍細胞を攻撃・破壊する細胞として認識されており、事実、NK細胞の抗腫瘍効果¹⁹⁾については、多くの証左が得られている。即ち、株化腫瘍細胞を用いた実験では、NK活性の高いヌードマウスでは、活性の低い対照マウスに対してNK感受性腫瘍の増殖が遅く、生着率も低いこと²⁸⁾や、NK活性の低いページマウスでは、同系メラノーマ腫瘍やリンパ腫瘍の増殖が速く、転移率も高い²⁹⁾ことなどが知られている。また、自然発生腫瘍に関しても、マウ

ス乳腺腫³⁰⁾、リンパ腺腫³¹⁾や、ヒト白血病³²⁾などに対して弱いながらも細胞障害活性が認められている。生体においても、癌の発生初期や転移の初期段階での増殖抑制などの免疫監視機構において、重要な役割を演じている可能性がある。担癌生体での癌の発育進展に伴うNK活性については、癌の進行とともにNK活性の低下が認められるとする報告が多く³³⁾、この理由として、担癌による栄養状態の低下に誘発されるステロイド分泌過多³⁴⁾、流血中の抑制因子の存在³⁵⁾、サプレッサー細胞の増加³⁶⁾などが知られている。しかし、膀胱癌などでは、NK活性が低下しないとする報告³⁷⁾や、癌進行に伴うリンフォカインの誘導により、正常より高いNK活性を示す³⁸⁾という報告もあり、現在、著しく進行した患者でのNK活性の低下を認める以外は、一致した見解は得られていない。比較的栄養状態の良好な胃癌患者を対象とした著者の検討でも、各進行期と対照者との間に有意差は認められず、担癌のNK活性に及ぼす影響は、さほど大きくないという結果を得た。

IL-2は、抗腫瘍免疫の分野で、最近最も注目されているリンフォカインの一種で、Gillisら³⁹⁾によって、T細胞の長期継代培養を可能とするT細胞増殖因子として発見された。その後、Taniguchiら⁹⁾によって化学構造が明らかにされ、さらに、大腸菌での単一遺伝子由来のIL-2産生が可能となり、しかも、このrIL-2は、細胞由来の精製IL-2と同様の作用を示すことが確認されて以来、その生物学的活性に関しても多くの報告がなされている⁴⁰⁾。IL-2の主な作用としては、1)抗原特異的キラーT細胞の誘導、2)NK活性の増強、3)Lymphokine activated killer (LAK)の活性化、4)インターフェロン γ の産生、5)B細胞の増殖・分化など⁴⁰⁾が知られており、特に、キラー細胞、NK細胞、LAK細胞は、腫瘍に対する免疫抵抗性において重要な役割を果たしている。従って、免疫療法の観点からは、担癌生体においてもこれらの抗腫瘍活性が高まるかどうか、さらに、病期の進行に伴ってどのように変動するかを検討する必要があると思われる。しかるに、胃

Table 3. Correlation between OK-432-stimulated IL-2 production and other immunological parameters such as NK activity and Su-PS skin test in gastric cancer patients

	Production of IL-2 by OK-432 stimulation	
	high responder (>10U/ml)	low responder (\leq 10U/ml)
Number of patients	10	22
NK activity (%)	50.0 \pm 18.0	48.0 \pm 18.6
Su-PS skin test (mm)	9.2 \pm 8.0	9.3 \pm 9.0

Values are expressed as mean \pm S.D.

癌患者末梢血リンパ球の rIL-2 に対する NK 活性の増強は、進行した II & III 期においても比較的保たれていることが判明し、IL-2 による免疫療法の有用性が示唆された。

現在、rIL-2 を用いた抗腫瘍免疫療法として、rIL-2 単独投与や rIL-2 により活性化した LAK 細胞とともに投与する養子免疫療法¹⁰⁾が行われているが、rIL-2 の血中半減期が短く、単独投与では抗腫瘍効果が得られなかったとする報告¹¹⁾や、LAK 細胞を誘導する際に多量のリンパ球が生体から得がたいことや、投与した LAK 細胞の生体内維持が困難なことなど、いまだ多くの問題を残している¹⁰⁾。そこで、もう一つの方法として、内因性の IL-2 産生を誘導する治療が考えられた。一般に、癌患者における IL-2 産生能は低下しているとの報告¹²⁾があり、この状態は、担癌生体の抗腫瘍機構の負の調節、即ち、NK 活性や LAK 活性などの、IL-2 の仲介する免疫反応の抑制に働くものと考えられる。一方、現在胃癌の免疫療法剤として広く用いられている OK-432 は、NCI (National Cancer Institute, U.S.A.) による BMR スクリーニングでも高い治療効果を持つとの評価を得ている¹³⁾が、本剤には IL-2 産生誘導能が認められており¹⁴⁾、IL-2 を介する反応が本剤の効果発現の重要な一経路と考えられている。

以上のような事実をもとに、健康成人および胃癌患者の OK-432 による IL-2 産生誘導能を検討した結果、1)健康成人においても胃癌においても無反応者がそれぞれ 30.0%、28.1%に認められ、IL-2 産生能は幅広い分布を示し個体差があること、2)IL-2 産生能は、癌の進行に伴い低下傾向を示したが、健康成人と有意差なく進行例でも比較的保たれていること、3)OK-432 に対する反応性の指標として現在用いられている Su-PS 皮内反応や、細胞性免疫能を示す NK 活性などの他の免疫パラメーターとの比較では、IL-2 産生の多寡により有意差はみられず、これらとは独立した反応と考えられたこと、などが判明した¹⁵⁾。これらのことから、in vitro での OK-432 による IL-2 産生誘導試験は、本剤適応の指標となる可能性が示唆された。

今回、物理生物学的性質が確立されている IL-2 を一つの手掛かりとして、胃癌患者における OK-432 の効果発現の解析を試みたが、他方では、OK-432 には他の幾つかの効果発現経路が認められていることや、IL-2 産生に対する血中の抑制物質の存在などが報告されており¹⁶⁾、単一の指標のみでは十分とは言えず、今後の課題と考えられる。また、今回用いたバイオアッセイは、細胞の状態によって測定値が不安定なことや、測定に時間がかかることなどの問題があり、この点に関しては、最近開発された抗 IL-2 モノクローナル抗体¹⁷⁾を用

いたラディオイムノアッセイなどによる簡便な方法が必要である。以上のごとく、胃癌患者末梢血単球の抗腫瘍活性に関する著者の検討では、進行した病期においても、リンパ球の賦活化が可能と考えられた。しかし、最も有力な BRM の一つと言われる OK-432 の全身投与によって、IL-2 を介する抗腫瘍効果を期待するならば、IL-2 産生能に個体差があることを認識した合理的な投与方法が望まれる。

結 論

胃癌患者における末梢血リンパ球の抗腫瘍活性およびその進行程度による変動を検討する目的で、リンパ球亜分画、NK 活性、rIL-2 による NK 活性の増強および免疫療法剤 OK-432 による IL-2 産生誘導に関する検討を行い、以下の成績を得た。

1. リンパ球亜分画は、胃癌組織学的進行程度 I ~ III 期においては、健康対照者と有意差を認めず、分画は比較的正常に保たれていた。進行した IV 期において、栄養状態などは健康対照者と差がないにも拘わらず、OKT3 および OKT4 陽性細胞数の減少が認められた。また、T4/T8 比、Leu7 陽性細胞に関しては、胃癌各期と対照者の間に有意差はなかった。

2. NK 活性は、健康対照者と胃癌各進行期との間に有意差はなく、進行例でも比較的保たれていた。

3. rIL-2 添加培養により、健康対照者および胃癌患者 II & III 期において、非添加群に比して有意な NK 活性の増強が認められた。

4. OK-432 刺激による IL-2 産生誘導は、健康成人および胃癌患者で幅広い分布を示し、個体差が著明であった。また、胃癌の進行に伴って低下傾向がみられたが、各進行期間に有意差はなかった。

5. OK-432 に対する反応の指標として用いられている Su-PS 皮内反応と、in vitro における OK-432 刺激 IL-2 産生能との間には相関は認められなかった。

以上より、胃癌患者の抗腫瘍免疫能に関して、IL-2 の賦活化作用が明らかとなった。さらに、IL-2 産生誘導能を有する BRM である OK-432 の有用性およびその IL-2 産生能が OK-432 の投与適応の新しい指標となる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師磨伊正義教授に心から謝意を表します。そして、直接御助言、御指導を賜りました金沢医科大学血清学越村三郎教授、本学がん研究所免疫生物部坂井俊之助教授に深く感謝いたします。また、NK 活性の測定など御教示いただいた金沢医科大学微生物学教室村山次哉博士に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 磨伊正義, 高橋 豊, 上野雅資, 浅井 透, 太田孝仁, 菅 敏彦, 沢口 潔, 北村徳治, 上田 博, 荻野知己, 秋本龍一: 胃癌の治療成績と化学療法の問題点. 北陸外会誌, 4, 1-6 (1985).
- 2) Moriyasu, F., Miwa, H., & Orita, K.: Immunochemotherapy of Gastric Cancer Patients with OK-432. In Y. Yamamura (ed.) Immunomodulation by Microbial Products and Related Synthetic Compound, 1st ed., p.442-445, Excerpta Medica, Amsterdam, 1982.
- 3) Yagawa, H., Ogawa, K., Otani, Y., Kajiwara, T. & Sakakibara, N.: Immunotherapy for Gastric Cancer After Surgical Treatment. In T. Hoshino (ed.), Proc. 13th Int. Congress Chemother., 1st ed. p.290-299, Excerpta Medica, Amsterdam, 1983.
- 4) 山村義孝, 安江満悟, 紀藤 毅, 中里博昭, 山田栄吉: OK-432 併用による胃癌の補助免疫化学療法. 癌と化療, 10, 1603-1609 (1983).
- 5) 山村義孝, 安江満悟, 中里博昭, 太田和雄: 非治癒切除胃癌に対する術後免疫化学療法 (第4次研究) - FT207 (経口) と OK-432 (皮内注) の併用 -. 癌と化療, 12, 541-548 (1985).
- 6) Ohldan, R. K.: Biological Response Modifiers Programme and Cancer Chemotherapy. Int. J. Tissue React., 4, 178-188 (1982).
- 7) Goldin, A., Chirigos, M. A., Macdonald, J. S., Fefer, A. & Mihich, E.: Biologic-Response Modifiers and Adjuvant Chemotherapy; Consideration of Selected Preclinical Investigation in Relation to Clinical Potential. Recent Results Cancer Res., 80, 351-356 (1982).
- 8) Oldham, R. K.: Biologicals and Biological Response Modifiers; Fourth modality of Cancer Treatment. Cancer Treat. Rep., 68, 221-223 (1984).
- 9) Taniguchi, R., Matui, H., Fujita, R., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. & Hamuro, J.: Structure and expression of cloned cDNA for human interleukin 2. Nature, 302, 305-310 (1983).
- 10) Rosenberg, S. A.: Adoptive Immunotherapy of Cancer; Accomplishments and Prospects. Cancer Treat. Rep., 68, 233-255 (1985).
- 11) Mazumder, A. & Rosenberg, S. A.: Successful Immunotherapy of Natural Killer Resistant Established Pulmonary Melanoma Metastasis by the Intravenous Adoptive Transfer of Syngeneic Lymphocyte; Activated in vitro by Interleukin 2. J. Exp. Med., 159, 495-507 (1984).
- 12) 後藤精俊: Interleukin 2 による胃癌組織浸潤リンパ球の cytotoxicity の増強. 日外会誌, 86, 1600-1607 (1985).
- 13) Ryner, A. A., Grimm, E. A., Lotze, M. T., Chu, E. W. & Rosenberg, S. A.: Lymphokine-Activated Killer (LAK) Cells Analysis of Factors Relevant to the Immunotherapy of Human Cancer. Cancer, 55, 1327-1333 (1985).
- 14) Hoshino, T. & Uchida, A.: Clinical and Experimental Studies in Immunotherapy., 1st ed., p. 48-70, Excerpta Medica, Geneva, 1983.
- 15) 胃癌研究会編: 外科・病理胃癌取り扱い規約. 改訂第11版, 12頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 16) Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F.: The Differentiation and Function of Human T Lymphocyte. Cell, 19, 821-827 (1980).
- 17) Herbermann, R. B., Nunn, M. E. & Lavrin, D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer, 16, 216-229 (1975).
- 18) Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H.: Natural killer cells in mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur. J. Immunol., 5, 112-117 (1975).
- 19) Herbermann, R. B.: Natural cell-mediated immunity against tumors, 1st ed., p.1-20, Academic Press, New York, 1980.
- 20) Herbermann, R. B.: NK cells and other natural effector cells, 1st ed., p.50-63, Academic Press, New York, 1982.
- 21) Gillis, S. & Watson, J.: Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an Interleukin 2-producing Human Leukemia T cell line. J. Exp. Med., 152, 1709-1719 (1980).
- 22) Gillis, S., Fern, M. M., Ou, W. & Smith, K. A.: T cell growth factor; parameters of production and a quantitative microassay for activity. J. Immunol., 120, 2027-2032 (1978).
- 23) Watanabe, Y., Yamada, T., Kobayashi, Y. & Sato, H.: Clinical significance of Su-poly-saccharide skin test as a parameter for immuno-

- chemotherapy with streptococcal preparation, OK-432. *Jpn. J. Cancer Chemother.*, 8, 1076 (1981).
- 24) Kung, P. C., Goldstein, G., Reinherz, E. L. & Schlossmann, S. F.: Monoclonal Antibodies Defining Distinctive Human T Cell Surface Antigens. *Science*, 206, 347-349 (1979).
- 25) Uchida, A. & Hoshino, T.: Clinical studies in cell mediated immunity in patients with malignant disease. *Cancer*, 45, 476-483 (1980).
- 26) Reinhert, E. L. & Schlossmann, S. F.: Current concepts in immunology. Regulation of the immunoresponse-inducer and supressor T-lymphocyte subsets in human beings. *N. Engl. J. Med.*, 303, 370-373 (1980).
- 27) Ginns, L. C., Miller, L. G., Goldenheim, P. D., Goldstein, G. & Bira, W. A.: Alterations in immunoregulatory cells in Lung Cancer and smoking. *J. Clin. Immunol.*, 2, 90-94 (1982).
- 28) Riesenfeld, I., Gidlund, M., Axberg, I., Alm, G. V. & Wigzell, H.: Positive correlation between in vitro NK activity and in vitro resistance towards AKR lymphoma cells. *Int. J. Cancer*, 25, 399-403 (1980).
- 29) Talmage, J. E., Mayers, K. M., Prieur, D. J. & Starkey, J. R.: Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. *Nature*, 284, 622-628 (1980).
- 30) Nunn, M. E., Herbermann, R. B. & Holden, H. T.: Natural cell mediated cytotoxicity against nonlymphoid tumor cells and some normal cells. *Int. J. Cancer*, 21, 221-279 (1977).
- 31) Serrate, S. A. & Herbermann, R. B.: Natural cell-mediated cytotoxicity against spontaneous mouse mammary tumors, 1st ed., p.1069-1076, Academic Press, New York, 1982.
- 32) Zarling, J. M., Eska, L., Borden, E. C., Horoszewics, J. & Carter, W. A.: Activation of human natural killer cells cytotoxic for human leukemia cells by purified interferon. *J. Exp. Med.*, 151, 1151-1165 (1980).
- 33) 大谷洋一: 癌患者の Natural killer (NK) 細胞活性に関する臨床的研究. *日臨外会誌*, 45, 569-583 (1984).
- 34) 辻 利男, 阿保七三郎, 工藤 保, 橋本正治, 川村養宏: 食道癌患者における Natural killer 活性値の臨床的意義. *日消外会誌*, 18, 8-14 (1985).
- 35) 漆崎 一郎: 癌と免疫抑制. *臨床免疫*, 11, 491(1979).
- 36) 湊 長博: NK 活性発現に影響する諸因子. *臨床免疫*, 16, 382-391 (1984).
- 37) Peter, H. H., Fisher, P. & Fridmann, J.: Cell mediated cytotoxicity in vitro of human lymphocytes against a tissue culture melanoma cell line (IGR3). *J. Immunol*, 115, 359 (1975).
- 38) 青池 成: 胃癌患者血中インタフェロンとその産生細胞に関する研究. *日消病会誌*, 82, 2723-2732 (1985).
- 39) Gillis, S. & Smith, K. A.: Longterm culture of tumor specific cytotoxic T cells. *Nature*, 268, 154-156 (1977).
- 40) 増田 徹, 笠倉新平: リフォカイン. 第1版, 61-76 頁, 講談社, 東京, 1986.
- 41) Lotze, M. T., Robb, R. J., Sharrow, S. O., Frana, L. W. & Rosenberg, S. A.: Systemic administration of interleukin2 in humans. *J. Biol. Response Mod.*, 3, 475-482 (1984).
- 42) 高後 裕, 笹川 裕, 坂巻純雄, 蟹沢裕司, 秋山正晴, 新津洋司郎, 漆崎一郎: 消化器癌患者の interleukin2 産生能低下に関する機構の解析. *消と免疫*, 12, 23-26 (1984).
- 43) Talmage, J. E. & Herberman, R. B.: The preclinical screening laboratory: Evaluation of immunomodulatory and therapeutic properties of biological response modifiers. *Cancer Theat. Rep.*, 70, 171-182 (1986).
- 44) Ichimura, O., Suzuki, S., Sugawara, Y. & Ogawa, T.: Lymphokines induction by streptococcal preparation OK-432 (picibanil) in mice. In T. Hoshino (ed.), *Proc. 13 th Int. Congress Chemother.*, 1st ed. p.50-72, Excerpta Medica, Amsterdam, 1985.
- 45) 磨伊正義, 高橋 豊, 上野雅資: 胃癌の生物学多様性に基づいた集学的治療の理念. *Oncologia*, 20, 51-61 (1987).
- 46) Chouaib, S. & Fradelizi, D.: The mechanism of inhibition of human IL-2 production. *J. Immunol*. 1296, 2463-2470 (1982).
- 47) Sato, H., Natsume-Sakai, S., Miyawaki, T., Taga, K., Hatano, M. & Taniguchi, N.: Monoclonal antibody which has the neutralizing activities for human IL-2. *J. Biol. Response Modifi.*, 5, 191-201 (1986).

Immunological Study on the Tumoricidal Activity of Peripheral Blood Lymphocytes in Patients with Gastric Cancer Masashi Ueno, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., **96**, 220—230 (1987)

Key words : gastric cancer, natural killer activity, interleukin 2, OK-432

Abstract

The present study was aimed at gaining insights into mechanisms by which OK-432 can augment immunity against tumor cells. In order to analyze immune capacity in gastric cancer patients, tumoricidal activities of peripheral blood lymphocytes (PBL) were examined using several nonspecific immunological parameters, including lymphocytes subsets, natural killer (NK) activity, augmented NK activity stimulated by recombinant interleukin 2 (rIL-2) and OK-432-induced-IL-2-production. In the analysis of lymphocytes subsets, OKT3-positive cell (Pan-T cell) and OKT4-positive cell (helper/inducer T cell) showed a decrease in number in stage IV. As for NK activity, no significant differences were observed between healthy adults and gastric cancer patients including stage IV. The NK activity of PBL stimulated by rIL-2 was enhanced both in healthy adults and in gastric cancer patients of stage II & III. Therefore rIL-2 stimulation of PBL resulted in an increase of NK activity even in patients at an advanced stage, indicating the usefulness of rIL-2 for immunocapacity. On the other hand, IL-2 production by PBL stimulated with OK-432 for 48 hours was not different between healthy adults and patients with gastric cancer and the levels of IL-2 produced varied markedly from case to case both in healthy adults and cancer patients, presumably depending upon the immune responsiveness regulated by genetic factors. Furthermore, there was no correlation between the amount of IL-2 production and Sulpolysaccharide skin test. These results suggest that the measurement of OK-432-induced IL-2 production by PBL in vitro might be a new test to evaluate the efficacy of OK-432 on NK activity in vivo.